

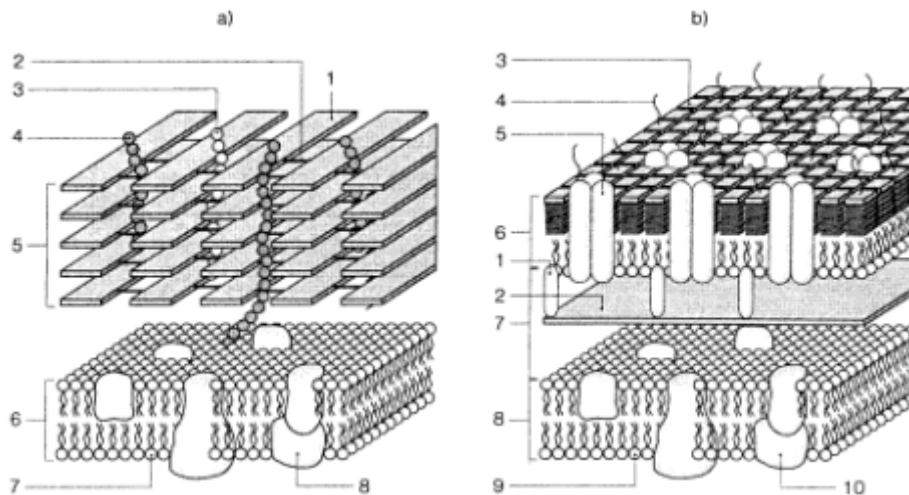
Murein (peptidoglykan) je základní stavební součástí buněčné stěny bakterií. Jeho polysacharidové řetězce obsahují střídavě zbytky n-acetylglukózinu a kyseliny n-acetylmuramové, na jejíž karboxyl je navázán řetězec čtyř aminokyselin v pořadí L-alanin, D-glutamová kyselina, další libovolná aminokyselina a D-alanin. Jednotlivé tetrapeptidové řetězce jsou vzájemně propojeny a právě účinkem lysozymu z mureinu vznikají disacharidové jednotky. Inhibiční aktivita tohoto enzymu je nejsilnější proti grampozitivním bakteriím, kterým chybí vnější membrána. Gramnegativní bakterie mohou být vystaveny působení lysozymu teprve po poškození nebo odstranění vnější membrány, např. prostřednictvím nisinu (narušuje membránu), EDTA nebo citrátu s chelatačním účinkem, kdy na sebe tyto látky váží vápenaté ionty a tím narušují stabilitu lipopolysacharidů v membráně.

7.1.3 Působení látek na buněčnou stěnu bakterií

Bakterie mají (na rozdíl od živočišných buněk) cytoplazmatickou membránu krytou buněčnou stěnou, která se u jednotlivých kmenů liší svou stavbou, tloušťkou i kvalitou. Buněčná stěna je nezbytná pro přežití bakterií, protože udržuje tvar buňky a zabezpečuje optimální vnitřní prostředí (vysoký intracelulární tlak). Poškození buněčné stěny nebo inhibice tvorby některé z komponent vedou k poruše její funkce, což může způsobit až lýzi buňky. Většina struktur bakteriální buněčné stěny se nevyskytuje v organismu člověka, proto je buněčná stěna pro inaktivaci mikroorganismu vhodným místem. Inhibice syntézy buněčné stěny je hlavním mechanismem účinku celé řady antibiotik (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy, vankomycin, bacitracin). Lysozym buněčnou stěnu z vnějšku hydrolyzuje.

Buněčná stěna **grampozitivních** bakterií (G+) o síle 20-80 nm je tvořena převážně silnou peptidoglykanovou vrstvou (15-20 nm), přičemž samotný murein představuje 10-50 % suché hmotnosti celé bakterie. K účinku antibiotik i lysozymu jsou G+ bakterie velmi citlivé.

Gramnegativní bakterie (G-) mají buněčnou stěnu tvořenou tenkou, ale pevnou peptidoglykanovou vrstvou (cca 10 nm), nad kterou se nachází ještě membrána tvořená dvojvrstvou fosfolipidů a bílkovin. Právě vnější fosfolipidová membrána brání průniku hydrofilních antibiotik (např. G penicilin). Tato antibiotika ovlivňují gramnegativní bakterie pouze v případě, že jsou schopna pronikat transmembránovými póry zevní membrány (např. ampicilin, amoxycilin). Vlastní murein tvoří cca 3 % suché hmotnosti buňky. I pro působení lysozymu musí mít G- bakterie poškozenou nebo odstraněnou vnější membránu, jinak jsou k účinkům těchto látek velmi málo citlivé.



Obr. 7.2: Rozdíly ve stavbě buněčné stěny G+ a G- bakterií:

a) Buněčná stěna grampozitivních bakterií:

1. polysacharidový řetězec peptidoglykanu (mureinu)
2. příčné propojení
3. polysacharid
4. kyselina teikoová
5. buněčná stěna
6. cytoplazmatická membrána
7. Fosfolipid
8. protein

b) Buněčná stěna gramnegativních bakterií:

1. lipoprotein
2. peptidoglykan
3. lipopolysacharid
4. antigeny
5. porinové trimery
6. vnější membrána
7. periplasmatický prostor
8. cytoplazmatická membrána
9. fosfolipid
10. protein

ÚLOHA 7: Stanovení lyzozymu metodou jednoduché radiální difúze

Lyzozym je látka enzymatické povahy. Rozkládá polysacharid murein, který je základní komponentou buněčných stěn bakterií. Lyzuje především grampozitivní bakterie, které mají mureinovou vrstvu nechráněnou vnější lipopolysacharidovou membránou. Vyskytuje se nejen u obratlovců (sliny, sekrety, krevní sérum, mléko, moč, pot, játra, cytoplazma fagocytů apod.), ale i u bezobratlých (hemolymfa) a některých rostlin (*Papaya latex*, *Ficus* apod.). Jednou z nejjednodušších metod stanovení lyzozymu je imunodifúze v agarózovém gelu.

Princip

Při této metodě je jedna ze složek (**bakterie**, protilátky nebo senzibilizované erytrocyty) rozpuštěna v agarózovém gelu a druhá (**lyzozym**, antigen, sérum s komplementem) difunduje z jamky radiálně do okolního gelu. Obě složky spolu interagují a dochází k lýze bakterií lyzozymem projevující se jako vyčeření okolí jamky. Aktivitu lyzozymu odráží velikost plochy, ve které došlo ke změně zakalení gelu.

Při manipulaci je potřeba dodržet správnou teplotu tak, aby byl gel tekutý, ale zároveň aby nedocházelo k denaturaci proteinů teplotou.

Výhody a nevýhody: jednoduchost, časová náročnost, nutná zkušenost a zručnost.

Chemikálie a roztoky

- bakteriální kultura - *Micrococcus luteus* (CCM 169)
- 1,25% agarózový gel s bakteriální kulturou
- zásobní roztok lyzozymu [5 mg/ml]: 1 mg lyofilizovaného lyzozymu má aktivitu přibližně 24 000 jednotek. Rozpuštěno v borátovém pufru.
- borát-fosfátový pufr (BFP), pH 7,4

Měřený vzorek

- myší sérum (získáme z předchozích cvičení), sliny, hemolymfa bource morušového nebo zavíječe voskového

Přístroje a pomůcky

Skleněná plotna 5 x 5 cm, Petriho misky na vlhkou komůrku, borát-fosfátový pufr, korkovrt napojený na vývěvu pro vysekávání jamek do agarových ploten, filtrační papír, polystyrenové zkumavky (2,5 ml).

Příprava skleněných ploten s agarózovým gelem:

1. Vyvážíme podložku na nalévání do vodorovné polohy.
2. Skleněnou plotnu (5 x 5 cm) očistíme alkoholem a necháme uschnout.
3. Připravenou skleněnou pipetu několikrát propláchneme horkou vodou.
4. Na plotnu nanese skleněnou pipetou 2,4 ml důkladně promíchané agarózy s bakteriální kulturou.
5. Gel necháme několik minut zatuhnout na kalibrované vodorovné ploše.

Z Petriho misky a vlhkého filtračního papíru připravíme vlhkou komůrku. Do ní umístíme skleněnou plotnu s agarózovým gelem, aby nevyschl.

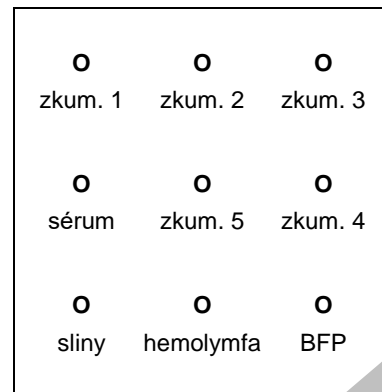
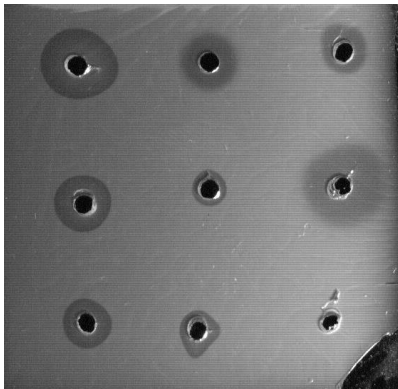
Postup

1. Každá plotna musí mít kalibraci, proto si do dvojice připravíme kalibrační řadu pěti zkumavek podle následujícího schématu. Koncentraci a aktivitu lysozymu dopočítejte.

Označení zkumavky	1.	2.	3.	4.	5.
Borát-fosfátový pufr	-	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Zásobní roztok lysozymu	20 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

Ředění:	1x	2x	4x	8x	16x
Koncentrace lysozymu [mg/ml]:					
Aktivita lysozymu [jednotek/ml]:					
Celkový objem:	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	20 μ l

2. Korkovrtem napojeným na vývěvu vysekáme do agarózy jamky dle šablony:



3. Do každé jamky napipetujeme 2,6 μ l vzorku podle schématu v bodě 2.
4. Desky inkubujeme 48 hodin ve vlhké komůrce při 4 °C.
5. Lyzozym difunduje do okolí jamek a lyzuje bakterie v gelu, čímž dochází k vyčerení gelu (viz obr. u bodu 2). Pomocí speciálního měřítka SEVAC odečteme druhé mocniny poloměrů prstenců okolo jamek.

Hodnocení

Sestavte kalibrační křivku z jamek č. 1, 2, 3, 4 a 5 jako lineární závislost druhých mocnin průměrů prstenců na koncentraci lysozymu (v těchto jamkách je ředěný zásobní roztok lysozymu a tudíž znáte jeho přesnou koncentraci a aktivitu). Určete rovnici regrese kalibrační přímky a hodnotu spolehlivosti (R). Pomocí rovnice regrese kalibrační přímky určete koncentraci lysozymu v ostatních vzorcích (myší sérum, sliny a hemolymfa). Vypočtenou koncentraci a aktivitu v jednotlivých vzorcích doplňte do tabulky v postupu.

Vyjde-li Vám některá z hodnot průměru prstence mimo rozsah kalibrační křivky, nelze koncentraci v tomto vzorku spočítat podle kalibrační křivky. Důvodem tohoto je, že neznáme chování systému mimo rozsah kalibrační křivky. Chyba by v tomto případě mohla být velmi značná.

Výstup

Výstupem této metody jsou 2 hodnoty, které udávají koncentraci a aktivitu lysozymu ve vzorku.

- v protokolu uveďte **tabulku** obsahující hodnoty:
 1. druhých mocnin průměrů prstence
 2. koncentrace lysozymu
 3. aktivity lysozymu

V tabulce uveďte nejen hodnoty pro jednotlivé vzorky, ale také pro kalibrační zkumavky 1 – 5. Můžete využít tabulku z postupu.

- **bodový graf** kalibrační křivky s rovnicí regrese a hodnotou spolehlivosti (R)
- **sloupcový graf** s porovnáním koncentrace lysozymu ve vzorcích myšního séra, slin a hemolymfy